

0716468-/

На правах рукописи

ШАКИРОВ ЕВГЕНИЙ ВИТАЛЬЕВИЧ

**ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗА *Bacillus intermedius* 3-19.
БИОСИНТЕЗ, ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА,
КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ**

03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2000

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И.Ульянова-Ленина и в лаборатории Химии белка Химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000947699

Научные руководители:

доктор химических наук,
профессор Г.Н.Руденская
(МГУ, Москва)
доктор биологических наук,
академик АН Татарстана,
профессор И.Б. Лещинская

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Г.И.Эль-Регистан
(Институт микробиологии РАН, Москва)
доктор биологических наук,
профессор В.И.Чиков

Ведущая организация:

Научно-исследовательский ветеринарный
институт (НИВИ), г. Казань

Защита диссертации состоится 31 мая 2000 г.
в 14ч.30м часов на заседании диссертационного совета К 053.29.19 при
Казанском государственном университете им.В.И.Ульянова-Ленина, 420008,
г.Казань, ул.Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан 28 апреля 2000 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Белки - основные «рабочие» единицы клетки, осуществляющие множество различных реакций и процессов и являющиеся неотъемлемой частью структуры самой клетки. Синтез и само существование белков, как и любых других составляющих клеток, подвергается строжайшему контролю и регуляции со стороны факторов, ответственных за развитие клетки. Старые, поврежденные или избыточные белковые молекулы должны быть разрушены для того, чтобы клетка смогла развиваться дальше. Этот процесс - быстрое и селективное расщепление химически устойчивой пептидной связи в белках - решается с помощью протеолитических ферментов - протеиназ - уникальных биологических катализаторов, в миллиарды раз ускоряющих реакцию гидролиза белков. Энергия, необходимая для расщепления пептидной связи в белках в нейтральной водной среде при комнатной температуре, настолько велика, что спонтанный гидролиз во многих случаях не происходит даже при инкубации в течение нескольких месяцев. Однако, при температуре 37 ° и нейтральном pH одна молекула протеиназы способна вызвать протеолиз 100 пептидных связей в секунду.

Протеолитические ферменты выполняют в клетке ряд жизненно важных функций. Кроме участия в деструктивных катаболических процессах протеолитические ферменты функционируют на этапе посттрансляционного процессинга белков, участвуют в клеточной дифференцировке, в том числе у прокариот, в таком важном с общебиологических позиций процессе, как переход вегетативных клеток к спорообразованию, то есть в анабиотическое состояние. Они осуществляют селективный протеолиз белков, связанный с изменением метаболизма.

Протеолитические ферменты широко используются в молекулярной биологии в качестве инструментов для изучения первичной структуры белков и пептидов; с другой стороны, сами протеазы являются удобными объектами для изучения механизмов функционирования белков (Breddam K. et al., 1992).

Протеолитические ферменты применяются в производстве моющих средств, кожевенной и пищевой промышленности. Они также нашли широкое применение во многих областях медицины, их используют для лечения опасных ожоговых поражений, для ускорения заживления ран, восстановления повреждений после переломов и травм (Сахаров И.Ю. и др., 1993), при защите организма от вирусных инфекций и роста раковых клеток (Otake S et al., 1991).

Нами было установлено, что бактерии *Bacillus intermedius* наряду с другими гидролазами (ферменты, расщепляющие связи в биологических молекулах - рибонуклеаза, фосфатаза) секретируют несколько сериновых протеиназ, одна из которых по предварительным данным относится к группе глутамилэндопептидаз - ферментов, расщепляющих пептидные связи, образованные карбоксильными группами глутаминовой и аспарагиновой кислот. Представлялось интересным выделить и охарактеризовать этот фермент, который расширяет наши представления о глутамилэндопептидазах класса сериновых протеиназ, рассматривающиеся как отдельная эволюционная ветвь с кардинальным изменением специфичности действия.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие экспериментальные задачи:

1. Оптимизация состава питательной среды для получения максимальной продукции глутамилэндопептидазы.
2. Выделение и очистка глутамилэндопептидазы из культуральной жидкости *B. intermedius* ; получение гомогенного препарата фермента.
3. Изучение основных физико-химических и энзиматических свойств протеиназы.
4. Выращивание и предварительный анализ кристаллов для рентгеноструктурного изучения белка.

Научная новизна работы. Впервые обнаружена внеклеточная глутамилэндопептидаза *B.intermedius*. Определены оптимальные условия для продукции протеиназы. Разработан эффективный лабораторный метод получения гомогенного препарата глутамилэндопептидазы, основанный на высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определены физико-химические

им. П. П. Лобачевского
Ивановское г-з. университет

характеристики и энзиматические свойства фермента. Впервые в отечественной науке получены кристаллы глутамилэндопептидазы *B.intermedius*, позволяющие проводить рентгеновские исследования структуры этого белка. Полученные результаты дают возможность пополнить новым, ранее неизученным бактериальным ферментом группу глутамилэндопептидаз, входящих в семейство химотрипсина класса сериновых протеиназ.

Практическая ценность работы. Оптимизированы условия биосинтеза глутамилэндопептидазы. Разработан метод очистки фермента, с помощью которого можно получить 2-3 мг гомогенного белка из 1 л культуральной жидкости.

Нами показано, что выделенная и охарактеризованная протеиназа относится к группе глутамилэндопептидаз, специфичность действия которых целиком определяется присутствием в субстрате отрицательно заряженных боковых цепей глутаминовой и аспарагиновой кислот. Уникальные свойства этого фермента делают возможным его использование в качестве инструмента для изучения первичной структуры белков и удобной модели для конструирования протеиназ с модифицированными свойствами.

Полученные впервые в России кристаллы глутамилэндопептидазы *B.intermedius* позволили провести рентгеновские исследования структуры этого белка с целью выяснения уникального механизма субстратной специфичности фермента.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на VIII Европейском конгрессе по биотехнологии (Будапешт, Венгрия, 1997), VI Симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 1997), VII Конференции по промышленному использованию ферментов (Барселона, Испания, 1997), 17 Международном конгрессе по биохимии и молекулярной биологии (Сан-Франциско, США, 1997), II съезде Биохимического общества РАН (Москва, 1997), VII Международной конференции по кристаллизации биологических макромолекул (Гранада, Испания, 1998), 13 Симпозиуме по белкам (Бостон, США, 1999).

Публикации. Опубликовано 17 работ по материалам диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения

результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 10 таблиц, 22 рисунка. Список литературы включает 145 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали стрептомициноустойчивый штамм *Bacillus intermedius* 3-19 (В-3833, Всесоюзная коллекция промышленных микроорганизмов), выделенный из дикого штамма *Bacillus intermedius* 7P (коллекция кафедры микробиологии Казанского государственного университета) путем естественного рассева на среде со стрептомицином в концентрации 500 мкг/мл. Штамм *B. intermedius* 3-19 был отобран среди других антибиотикоустойчивых штаммов *B. intermedius* по признаку максимальной протеолитической активности.

Для культивирования клеток *B. intermedius* в качестве исходной использовали среду без глюкозы следующего состава (г/л): пептон - 20; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaCl - 3,0; MnSO_4 - 0,1; pH - 8,5 (Лещинская И.Б. и др., 1981).

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при длине волны 590 нм. Продуктивность культуры (П) в отношении синтеза протеиназы определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах или процентах относительно контроля. Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ оптической единице (оп.ед.) в кювете толщиной 1 см. Протеолитическую активность определяли по казеину (Каверзнева Е.Д., 1971) и по синтетическому хромогенному субстрату (Мосолова О.В., и др., 1987).

Для выделения и очистки глутамилэндопептидазы использовали ионообменную хроматографию на КМ-целлюлозе и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Степень чистоты препарата и молекулярную массу фермента определяли электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 0,1% DS-Na по методу Лаэммли (Laemmli H.K., 1970).

Изоэлектрическую точку фермента определяли хроматофокусированием (Sluyterman L. et al., 1978) на Увикорде («ISCO»), используя колонку с гелем PBE-94 («Pharmacia», Швеция).

При изучении влияния специфических ингибиторов на активность глутамилэндопептидазы использовали DFP, PMSF, TLCK, ЭДТА, $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$,

бензамидин «Sigma» (Германия) в соотношении фермент:ингибитор = 1:100. Белковые ингибиторы использовали в молярном соотношении 1:10.

Субстратную специфичность фермента изучали по действию на синтетические субстраты H-Arg-Lys-Glu-Val-Tyr-OH и H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH и по расщеплению А и В цепей окисленного инсулина и глюкагона.

Для определения аминокислотного состава фермент гидролизовали 5,7 н HCl при 105° в вакуумированных ампулах в течение 48 ч и гидролизат анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония). Остатки полуцистина и метионина определяли после их окисления надмуравьиной кислотой, триптофан - после гидролиза белка метансульфоновой кислотой в присутствии 0,2%-ного триптамина. N-концевую последовательность глутамилэндопептидазы определяли по методу Эдмана в образцах, полученных после дополнительной очистки хроматографией на колонке (4,6x100 мм) Aquapore («Applied Biosystems», USA) в градиенте концентрации (15-60%) ацетонитрила с 0,1% трифлуороуксусной кислотой в течение 40 мин с помощью HPLC. Белок затем иммобилизовали на мембранах Immobilon P и секвенировали на приборе Knauer-816 («Applied Biosystem» 120 A PИH, Analyzer One Line, USA).

Кристаллизацию глутамилэндопептидазы проводили методом диффузии паров растворителя в «висячей капле» при комнатной температуре. Объем капли белкового раствора равнялся 2,5-10 мкл. Концентрация белка в капле составляла 6-15 мг/мл, фосфата калия-0,4-0,8 М, 2-метилпентандиола-2,4 - 3%. Через 5-7 дней вырастали небольшие тонкие пластины (0,05-0,1 мм). Их промывали 1,15 М раствором фосфата калия, рН 7,0 для активации поверхности и помещали в раствор для разращивания (1,2 М фосфат калия, рН 7,0, содержащий 0,6% белка). При выдерживании в этом растворе кристаллы достигали максимального размера за три-четыре дня. Набор дифракционных данных был собран до разрешения 1,7 Å на автоматическом синхротроне (EMBL Hamburg Station).

Для анализа цифрового материала экспериментов исследования проводили математическую обработку результатов (Плохинский Н.А., 1978).

Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 10\%$. В качестве критерия достоверности разности использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0,05$ за достаточный уровень значимости.

Наряду с традиционным изучением влияния отдельных факторов использовали многофакторные эксперименты. Обработка результатов эксперимента проводилась с помощью комплекса компьютерных программ

«ВЮРТ», включающего программы обработки результатов многофакторных экспериментов (Краснов С.И. и др., 1992).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Отбор активных штаммов и исследование состава питательной среды для обеспечения высокой продукции глутамилэндопептидазы

B.intermedius 3-19

Среди 16 антибиотикоустойчивых штаммов *Bacillus intermedius* был отобран стрептомицинустойчивый штамм *Bacillus intermedius* 3-19 по принципу максимальной активности по хромогенному субстрату Z-Glu-pNA, который и использовали в дальнейшей работе.

Динамика роста культуры и биосинтеза фермента на исходной среде (Лещинская И.Б., 1981) представлена на рис.1. Согласно модели Колемана, синтез катаболических ферментов микроорганизмов представляет собой двухфазный процесс, при котором максимальный синтез ряда ферментов наступает в период замедления или полного прекращения роста культуры (Coleman G. et al., 1975). Глутамилэндопептидаза *B.intermedius* появляется в культуральной жидкости в стадии замедления роста культуры, активность фермента достигает максимума в стационарной фазе на 18-й час роста. Таким образом, глутамилэндопептидаза *B.intermedius* относится к ферментам второй фазы, синтез которых осуществляется в фазе замедления роста.

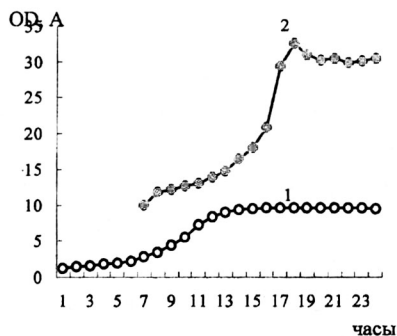


Рис.1 Динамика роста и биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

1 - биомасса, опт. ед., 2 - активность, мкМ/мл

Согласно данным литературы биосинтез ряда микробных протеиназ подавляется глюкозой. Исследование влияния глюкозы и других легкометаболизируемых источников углерода на биосинтез глутамилэндопептидазы показало, что присутствие в среде минимальной концентрации глюкозы или мальтозы (0,5%) вызывало снижение продуктивности бактерий на 50% (рис.2). Увеличение концентрации глюкозы приводило к значительному снижению продуктивности культуры. Присутствие в среде галактозы, лактозы и сахарозы также приводило к снижению биосинтеза протеиназы, но в меньшей степени. Аналогичные результаты были получены для тиолзависимой сериновой протеиназы *B.intermedius* 3-19 (Ицкович Е.Л. и др., 1995) и протеазы *Streptomyces* sp G-157 (Sampath P. et al., 1998). Таким образом, подобно синтезу других протеиназ, синтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius* подавляется легкометаболизируемыми источниками углерода, по-видимому, по типу катаболитной репрессии.

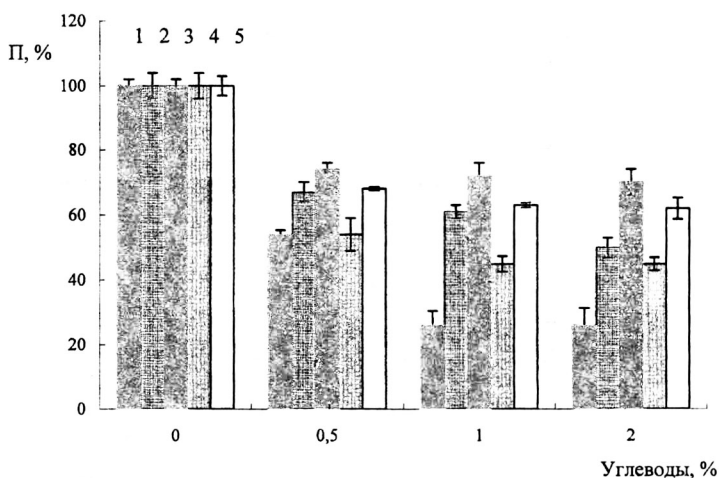


Рис.2 Влияние углеводов на биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius*
1-глюкоза, 2-галактоза, 3-лактоза, 4-мальтоза, 5-сахароза

Было исследовано влияние различных типов пептона и их концентраций, а также неорганического фосфата на биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Исследование проводили с применением метода математического планирования эксперимента по плану В2 (Максимов В.Н., 1980), где концентрации двух факторов - пептона (X1) и неорганического фосфата (X2) - варьировались на

трех уровнях (табл.1). С помощью программы “BIOPT” получены уравнения регрессии, по которым были рассчитаны оптимальные концентрации пептона и неорганического фосфора - 20 г/л и 0,2 г/л соответственно, которые и использовались для достижения максимального выхода фермента. Из исследуемых пептонов был отобран пептон растительного происхождения производства Тбилисского завода, так как активность протеиназы на среде с ним была в 2 раза выше, чем на средах с другими.

Одним из путей регуляции биосинтеза внеклеточных ферментов является регуляция конечным продуктом, которым для глутамилэндопептидазы могут служить аминокислоты. Присутствие в среде индивидуальных аминокислот, как правило, ингибирует синтез протеиназ. Мы исследовали влияние ряда индивидуальных аминокислот, а также комплекса аминокислот (казаминовые кислоты) на биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Добавление в питательную среду, содержащую пептон, индивидуальных аминокислот в той или иной степени подавляет биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Внесение казаминовых кислот в среду культивирования подавляет рост бактерий в 2 раза, активность же снижается незначительно.

Таблица 1

Оптимизация состава питательной среды по плану В2 для биосинтеза протеиназы *B.intermedius* 3-19 на пептоне растительного происхождения

Уровни факторов				Биомасса, опт.ед.	Активность, мкМ/мл	Продуктивность, усл.ед
Пептон		Фн				
X1	г/л	X2	г/л			
+	30	+	0,3	14,0	10,7	0,76
-	10	+	0,3	5,5	9,0	1,64
+	30	-	0,1	12,5	11,5	0,92
-	10	-	0,1	5,9	14,6	2,47
+	30	0	0,2	13,9	12,0	0,86
-	10	0	0,2	5,3	12,8	2,42
0	20	+	0,3	12,0	23,8	1,98
0	20	-	0,1	10,9	22,2	2,04

Полученные данные позволяют предположить наличие чувствительности синтеза внеклеточной глутамилэндопептидазы к азотметаболической репрессии. Похожий эффект был получен для других внеклеточных протеиназ (Колев Д.А., 1986, Ицкович Е.Л. и др., 1995).

Казаминовые кислоты при культивировании микроорганизмов могут служить источником одновременно и углерода и азота. При исследовании влияния казаминовых кислот в качестве единственного источника углерода и азота на рост бактерий и синтез фермента было показано, что урожай клеток понижается в 3,5 раза по сравнению с контрольной средой, а активность снижается на 15-20% в зависимости от концентрации казаминовых кислот. Похожий эффект был получен для тирозинзависимой сериновой протеиназы *B.intermedius* 3-19 (Ицкович Е.Л. и др., 1995), для кислой протеиназы *Candida albicans* (Banerjee A. et al., 1991), для протеиназы *B.megaterium* (Morosova J. et al., 1984). При добавлении в питательную среду дрожжевого экстракта увеличивался урожай клеток и активность фермента, однако продуктивность культуры не увеличивалась. Ионы аммония, внесенные в среду в виде соли NH_4Cl стимулируют синтез фермента на 15% по сравнению с контролем.

Для каталитической активности протеиназ важную роль играют ионы двухвалентных металлов. Известно, что ионы Ca^{2+} стабилизируют молекулу глутамилэндопептидазы, при этом повышается активность фермента (Руденская Г.Н., 1998, Мосолова О.И. и др., 1987). Мы провели изучение влияния ионов ряда двухвалентных металлов на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости *B.intermedius* (рис.3). Из рисунка видно, что наличие в среде ионов Mg^{2+} в концентрации 2 мМ и ионов Ca^{2+} в концентрации 5 мМ является оптимальным для биосинтеза глутамилэндопептидазы. Присутствие в среде ионов Co^{2+} в концентрации 3 мМ увеличивало продуктивность в 2,5 раза. Однако, при этом наблюдалось сильное ингибирующее действие на рост микроорганизмов (оптическая плотность уменьшалась в 4 раза), активность же фермента увеличивалась незначительно, в связи с чем ионы кобальта не вводились в среду культивирования. При исследовании локализации глутамилэндопептидазы в клетках и культуральной жидкости *B.intermedius* было показано, что фермент обнаруживается на мембране и что соли кобальта, вероятно, влияют на процесс диссоциации фермента с мембраны, способствуя выходу мембраносвязанного белка в среду с образованием внеклеточного фермента (Шарипова М.Р. и др., 2000).

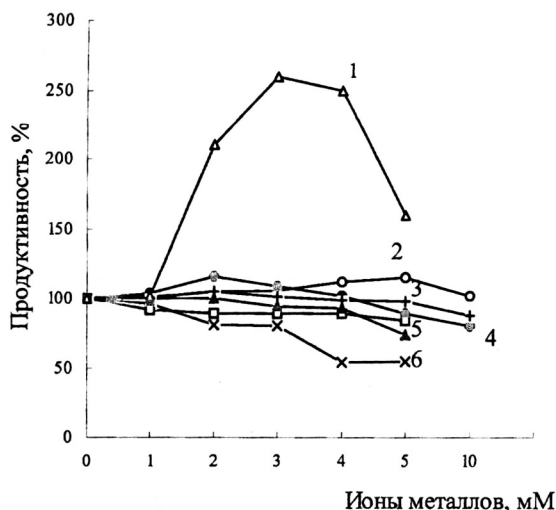


Рис.3. Влияние ионов двухвалентных металлов на биосинтез глутамилэндопептидазы *B. intermedius*

1 – ионы кобальта; 2 – ионы кальция; 3 – ионы марганца; 4 – ионы магния; 5 – ионы меди; 6 – ионы железа; 7 – ионы цинка.

За 100% принята продуктивность культуры без ионов металлов

$\sigma \leq 10\%$

Таким образом, проведенные исследования позволяют отметить, что регуляция биосинтеза глутамилэндопептидазы *B. intermedius* осуществляется аналогично регуляции синтеза других протеиназ, а именно, подавляется легкометаболизируемыми источниками углерода по типу катаболитной репрессии и комплексом аминокислот по типу репрессии синтеза фермента конечным продуктом, однако имеются некоторые особенности, например, увеличение продукции глутамилэндопептидазы в присутствии ионов кобальта в среде.

2. Выделение и очистка глутамилэндопептидазы *B. intermedius*

Для характеристики глутамилэндопептидазы *B. intermedius* необходимо иметь фермент в гомогенном состоянии. Нами разработан метод выделения и очистки глутамилэндопептидазы из культуральной жидкости *B. intermedius* с помощью

ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS. На рис.4 представлены результаты хроматографии, включающие 3 белковых пика: белки первого пика элюировались при ионной силе 40 мМ NaCl, второго - при 55 мМ NaCl, третьего - при 70 мМ NaCl. С помощью набора хромогенных субстратов установлено, что второй белковый пик представляет собой глутамилэндопептидазу, расщепляющую субстрат Z-Glu-pNA. Из 2 л культуральной жидкости получено 5 мг гомогенного белка со степенью очистки 770 и выходом 12% (табл.2). Все дальнейшие исследования были проведены с этой протеиназой.

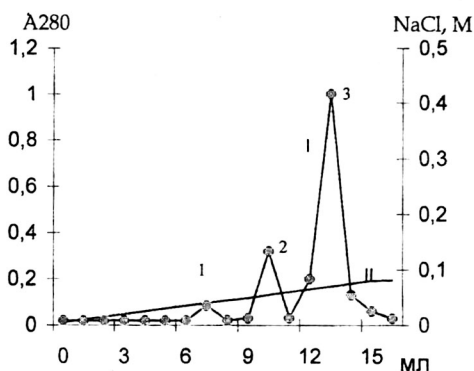


Рис.4. Хроматография глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* на колонке MonoS

I - A₂₈₀; II - градиент NaCl (0-0,5М) в 15 мМ Na-ацетатном буфере, pH 6,3, содержащем 0,5 мМ CaCl₂.

1 - протеиназа, активная на субстрате Glp-Ala-Ala-Leu-pNA,

2 - протеиназа, активная на субстрате Z-Glu-pNA,

3 - протеиназа, активная на субстрате Z-Ala-Ala-Leu-pNA

3. Характеристика глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

Чистоту полученного препарата глутамилэндопептидазы определяли с помощью электрофореза в ПААГ, который показал наличие одного полипептида с молекулярной массой 29 кДа. Гомогенность препарата глутамилэндопептидазы подтверждается также обнаружением единственной N-концевой аминокислотной последовательности при секвенировании по Эдману. Изoeлектрическая точка

равна 8,4 (рис.5). Константа Михаэлиса глутамилэндопептидазы *B.intermedius* на субстрате Z-Glu-pNA $K_m=6$ мМ.

В таблице 3 представлены некоторые энзиматические свойства глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в сравнении с другими протеиназами того же семейства, выделенных из разных источников.

Таблица 2.

Выделение глутамилэндопептидазы из культуральной жидкости

Bacillus intermedius

Стадии очистки	Объем, мл	Общий белок, сп.ед.	Общая активность, мкМ	Уд.акт., ед/мг	Выход, %
1. Культуральная жидкость	2000	32000	50	0.0016	100
2. Хроматография на на КМ-целлюлозе	71	71	17	0.24	34
3. Рехроматография на КМ-целлюлозе	9.5	32.3	8.5	0.26	17
4. Хроматография на колонке MonoS	7.6	4.8	5.92	1.23	11.8

Протеиназа *B.intermedius* имеет один pH-оптимум на субстрате Z-Glu-pNA (pH 8,0) и два pH-оптимума на белковом субстрате (pH 7,5 и 9,0), как и протеиназы *Actinomyces sp.*, *Str.thermovulgaris* и стафилококковые глутамилэндопептидазы. Факт наличия двух pH-оптимумов пока не получил в литературе удовлетворительного объяснения. Протеиназа относительно стабильна в широких пределах pH от 6,5 до 10,0 в течение 3 час при 22 ° (рис.6). Наличие в реакционной смеси 5 мМ Ca^{2+} повышает стабильность фермента, несколько увеличивая его активность. Такую же pH-стабильность показывают почти все известные на настоящий момент глутамилэндопептидазы.

Температурный оптимум, определенный в трис-HCl буфере, pH 8,0, в отсутствие ионов Ca^{2+} , равен 55 °. В присутствии ионов Ca^{2+} температурный оптимум смещается к 65 ° с возрастанием активности почти в 2 раза, что подтверждает стабилизирующую роль ионов Ca^{2+} (рис.7). При 70 ° фермент теряет около 50% активности.

Сравнительная характеристика глутамилэндопептидаз
микроорганизмов

Протеиназа	Мол. масса, кДа	pI	pH-оптимум активности		Интервал стабиль- ности pH	Темпера- турный оптимум, °	K _m *, мМ
			Пептид- ный субстрат	казеин			
<i>B.intermedius</i>	29	8.4	8.0	7.5; 9.0	6.5-10	55; 65 (Ca ²⁺)	6.0
<i>Str.thermovul- garis</i>	26	6.7	6.5	6.5; 8.0	6.0-10	55	1.25
<i>Actinomyces sp.</i>	25	5.7	8.5	6.0; 9.0	6.0-10	55	1.1
<i>S.aureus</i> 92 гн	25	4.5	8.2	4.6; 8.0	5.0-10	40-45	10.0
<i>S.aureus</i> V8	26.5	4.5	-	4.0; 7.8	3.5-9.5	45	28.4
<i>B.licheniformis</i>	23.567	4.8	8.0	-	4.0-10	51 (Ca ²⁺)	1.8
<i>Str.griseus</i>	18.336	8.4	8.8	-	5.0-8.0	-	-
<i>Str.fradiae</i>	18.702	8.2	8.2	-	4.5-9.0	-	-
<i>B.subtilis</i>	17-18	7.7	8.0			55	-
<i>Thermoactino- myces sp.</i>	23	-	8.5	8.5	5.0-11.0	55	-

* Для реакции гидролиза Z-Glu-pNA

Термостабильность фермента при pH 8,0 в присутствии 5 мМ Ca²⁺ увеличивается только в диапазоне температур от 37 до 50 °, а затем происходит резкая потеря активности (рис.8). Похожие свойства отмечены для некоторых других глутамилэндопептидаз (Мосолова О.В. и др., 1987, Хайдарова Н.В. и др., 1989).

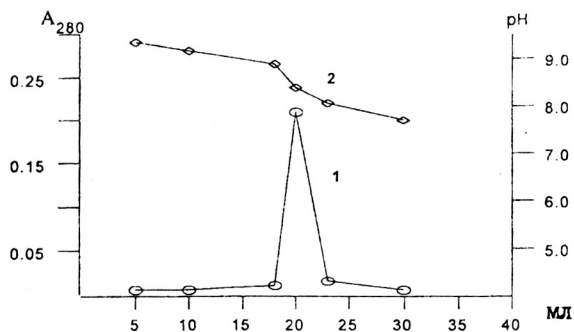


Рис.5. Определение изоэлектрической точки *B. intermedius* методом хроматофокусирования на колонке РВЕ-94 в градиенте рН 9,4-7,7
1 – A_{280} , 2 – градиент рН

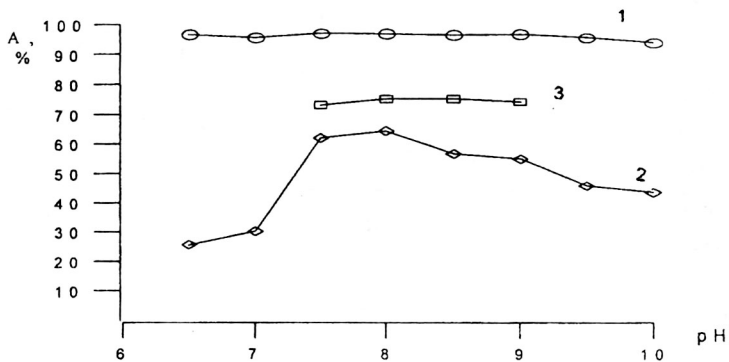


Рис.6. рН-стабильность глутамидэндопептидазы *B. intermedius* при 22 °
1 – 3 часа инкубации, 2 – 24 часа инкубации в отсутствии ионов Ca^{2+}
3 – 24 часа инкубации в присутствии ионов Ca^{2+}

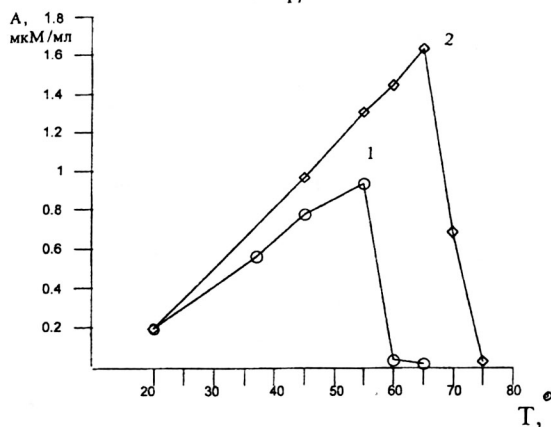


Рис.7. Зависимость активности протеиназы *B.intermedius* от температуры

- 1 – активность в отсутствии ионов Ca^{2+} ,
 2 – активность в присутствии ионов Ca^{2+}

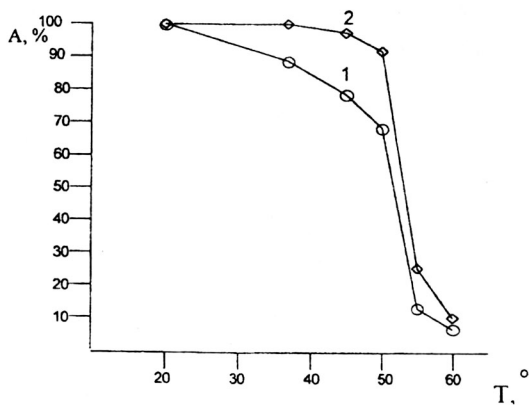


Рис.8. Термостабильность глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

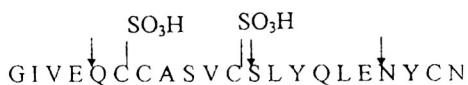
- 1 – активность в отсутствии ионов Ca^{2+} ,
 2 – активность в присутствии ионов Ca^{2+}

Активность фермента полностью подавляется специфическим ингибитором сериновых протеиназ - диизопропилфторфосфатом. Другие ингибиторы сериновых протеиназ - химической и белковой природы - не оказывают влияния на активность фермента.

При изучении субстратной специфичности глутамилэндопептидазы *B.intermedius* было показано, что фермент практически полностью расщепляет синтетический субстрат H-Arg-Lys-Glu-Val-Tyr-OH по связи Glu-Val за 30 минут. В таких же условиях фермент гидролизует только 5,6% субстрата H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH по связи Asp-Val. Таким образом, фермент проявляет большее предпочтение к связям, образованным глутаминовой кислотой, чем аспарагиновой кислотой, что характерно для ферментов этой группы.

Специфичность фермента на природных олигопептидных субстратах определяли по расщеплению А и В цепей окисленного инсулина, содержащих по два остатка глутаминовой кислоты, и глюкагона, имеющего в составе молекулы три остатка аспарагиновой кислоты (рис.9). За 4 часа фермент практически полностью гидролизовал в А и В цепи окисленного инсулина все связи, образованные глутаминовой кислотой и некоторые связи образованные цистеиновой кислотой, полученной в результате окисления цистеина. В молекуле глюкагона фермент расщеплял все связи по остаткам аспарагиновой кислоты. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными (Svendsen I. et al., 1992, Niidome T. et al., 1990, Yoshida N. et al., 1988).

А-цепь инсулина



В-цепь инсулина



Глюкагон



Рис.9. Гидролиз природных олигопептидных субстратов глутамилэндопептидазой *Bacillus intermedius*

Стрелками показаны гидролизуемые протеиназой пептидные связи

Определены аминокислотный состав и N-концевая последовательность глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Сравнительный анализ аминокислотного состава глутамилэндопептидазы *B.intermedius* и других протеиназ этого семейства ферментов показывает, что цистеин отсутствует только у стафилококковой протеиназы, у остальных протеиназ независимо от источника выделения имеется по 4 остатка полуцистина, и 2 остатка - у протеиназы *B.intermedius*. Фермент содержит в своем составе до 20% (от всего количества аминокислотных остатков) дикарбоновых кислот, что значительно меньше, чем в молекуле протеиназы *St.aureus* V8 (33%). Эта разница находит свое отражение в величине изоэлектрических точек ферментов: pI 8,4 и 4,5 соответственно.

N-концевая последовательность глутамилэндопептидазы *B.intermedius* на протяжении 30 аминокислот имеет 45% идентичных остатков при сравнении с глутамилэндопептидазой, выделенной из *B.licheniformis* (Svendsen I. et al., 1992, Kakudo S. et al., 1992). Столь значительный процент совпадений позволяет предположить, что глутамилэндопептидазы этих двух видов бацилл гомологичны и имеют однотипную укладку полипептидной цепи в пространстве. Высокий уровень совпадений наблюдается при сравнении с N-концевой последовательностью на протяжении 20 аминокислот для глутамилэндопептидазы *B.subtilis* (40%). Гораздо меньше совпадений при сравнении с N-концевыми последовательностями ферментов из стрептомицетов, а число совпадающих остатков при сравнении с протеиназой *St.aureus* V8 слишком мало для суждения об их гомологии (рис.10).

Таким образом, по физико-химическим и энзиматическим свойствам, по субстратной специфичности, по влиянию ингибиторов на активность протеиназы *B.intermedius* относится к группе глутамилэндопептидаз, специфичность действия которых целиком определяется присутствием в субстрате отрицательно заряженных боковых цепей глутаминовой или аспарагиновой кислот (КФ 3.4.21.19).

4. Выращивание и предварительный анализ кристаллов глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

В настоящее время неизвестен молекулярный механизм, обеспечивающий высокую специфичность действия глутамилэндопептидаз по отношению к аминокислотным остаткам с отрицательно заряженными боковыми цепями,

поскольку неизвестен компенсатор отрицательного заряда субстрата. Для выяснения молекулярного механизма действия таких ферментов необходимы

	1	5	10	15	20															
<i>Bacillus intermedius</i>	V	V	I	G	D	D	G	R	I	K	V	A	N	T	R	V	A	P	Y	N
<i>Bacillus licheniformis</i>	S	V	I	G	S	D	D	R	I	R	V	T	N	E	T	A	Y	P	Y	R
<i>Bacillus subtilis</i>	S	I	I	G	T	P	E	R	T	R	I	S	S	E	T	S	F	P	Y	R
<i>Staphylococcus aureus V8</i>	-	V	I	L	P	N	N	D	R	K	Q	I	T	D	T	T	N	G	H	Y
<i>Actinomyces species</i>	S	V	I	G	T	D	V	Y	A	N	V	Y	Y	G	F	-	K	Y	P	Y
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	S	D	I	G	T	N	T	G	W	M	I	N	A	D	T	V	A	T	A	G
<i>Streptomyces griseus</i>	V	A	G	G	D	A	I	Y	G	G	G	S	R	C	S	A	A	F	N	
<i>Streptomyces fradiae</i>	V	L	G	G	G	A	I	Y	G	G	G	S	R	C	S	A	A	F	N	

	25	30
<i>Bacillus intermedius</i>	X X X X I T F G — GS —	
<i>Bacillus licheniformis</i>	A I V H I S S S I GS —	
<i>Bacillus subtilis</i>	—	
<i>Staphylococcus aureus V8</i>	A P V I Y I Q V E A P T	
<i>Actinomyces species</i>	G I A	
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	D I	
<i>Streptomyces griseus</i>	V T K N G V R Y F L T	
<i>Streptomyces fradiae</i>	V T K G G A R Y F V T	

Рис.10. N-концевые последовательности глутамилэндопептидаз

знания пространственной структуры белка. Одним из основных способов определения структуры белка в настоящее время является кристаллография. Получение кристаллов глутамилэндопептидаз представляет трудную задачу. Например, до сих пор не удалось получить подходящие для рентгеноструктурного исследования кристаллы для давно известной протеиназы *St.aureus V8*. Был разработан метод получения кристаллов глутамилэндопептидазы *B.intermedius*, размеры и форма которых оказались пригодными для проведения рентгеновского исследования, а также проведен рентгеновский анализ этих кристаллов, который показал, что кристаллы принадлежат к пространственной группе C2 и имеют следующие параметры элементарной ячейки: $a=61,62 \text{ \AA}$, $b=60,4 \text{ \AA}$, $c=60,40 \text{ \AA}$, $\beta=117,6^\circ$. Набор дифракционных данных был собран до разрешения $1,68 \text{ \AA}$. В настоящее время благодаря полученным нами кристаллам в институте Кристаллографии РАН проведен полный рентгеноструктурный анализ глутамилэндопептидазы *B.intermedius* (результаты обрабатываются). Можно с

большой вероятностью предположить, что с помощью установленной пространственной структуры фермента будет раскрыт уникальный механизм действия глутамилэндопептидаз, позволяющий в значительной степени сдвигать рКа имидазольного кольца гистидина. Реализация этого механизма, вероятно, осуществляется различными способами в ферментах различного происхождения, что может служить отражением степени филогенетического родства этих белков и их продуцентов.

ВЫВОДЫ

1. Подобран состав питательной среды, обеспечивающий максимальный уровень активности глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости *B.intermedius* 3-19. При этом установлено, что синтез глутамилэндопептидазы ингибируется глюкозой и смесью аминокислот, активируется ионами кальция, магния и аммония.

2. Разработан метод выделения и очистки глутамилэндопептидазы из культуральной жидкости *B.intermedius* с помощью ионообменной хроматографии на колонках КМЦ и MonoS в режиме ВЭЖХ и получен гомогенный препарат фермента с выходом 12%.

3. Впервые охарактеризована глутамилэндопептидаза *B.intermedius*, которая имеет молекулярную массу 29 kDa и изоэлектрическую точку 8,4. Обнаружены два рН-оптимума на природном субстрате : при рН 7,5 и рН 9,0, на синтетическом субстрате - при рН 8,0. Температурный оптимум действия фермента 55 °С.

4. Установлено, что макромолекула глутамилэндопептидазы содержит два остатка полуцистина; показана 45%-ная гомология N-концевой последовательности протеиназы с известными глутамилэндопептидазами бацилл.

5. Анализ действия ингибиторов и субстратной специфичности показал, что фермент атакует только связи, образованные дикарбоновыми кислотами, что позволило отнести его к глутамилэндопептидазам семейства химотрипсина с кардинальным изменением специфичности действия (КФ 3.4.21.19).

6. Впервые в отечественной науке разработаны условия кристаллизации и получены кристаллы глутамилэндопептидазы *B.intermedius* 3-19. Предварительный рентгеновский анализ с разрешением 1,68 Å показал, что кристаллы принадлежат к пространственной группе C2 и имеют следующие параметры элементарной ячейки : $a=61,62 \text{ Å}$, $b=55,84 \text{ Å}$, $c=60,4 \text{ Å}$, $\beta=117,6^\circ$.

Публикации по теме диссертации

1. Нехотяева Н.В., Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Ицкович Е.Л., **Шакиров Е.В.** Внеклеточные гидролазы *Bacillus intermedius*. Выделение и свойства. /Деп. в ВИНТИ, N2642-B92, 26.09.95. - 18с.

2. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Ицкович Е.Л., **Шакиров Е.В.**, Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. Секретируемые гидролазы стрептомицинустойчивых бактерий *Bacillus intermedius* //Биохимия. - 1996. - Т.61, N1. - С.110-118.

3. Leshchinskaya I.B., **Shakirov E.V.**, Itskovich E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain 3-19 //FEBS Letters. - 1997. - V.404. - P.241-244.

4. Лещинская И.Б., **Шакиров Е.В.**, Ицкович Е.Л., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Благова Е.В., Левдииков В.М., Куранова И.П., Руденская Г.Н., Степанов В.М. Глутамилэндепептидаза *Bacillus intermedius* 3-19. Выделение, свойства, кристаллизация //Биохимия. - 1997. - Т.62, N8. - С.1052-1059.

5. **Shakirov E.V.**, Mardanova A.M. Glutamylendopeptidase from *Bacillus intermedius* /8 th European Congress of Biotechnology, 1997, Budapest, 17-21 august - P.144.

6. Лещинская И.В., **Шакиров Е.В.**, Балабан Н.П., Вирясов М.Б., Руденская Г.Н., Степанов В.М. Глутамилэндепептидаза *Bacillus intermedius* /IV Симпозиум «Химия протеолитических ферментов», 1997, Москва, 21-23 апреля. - С.42.

7. Благова Е.В., Левдииков В.М., Куранова И.П., Балабан Н.П., **Шакиров Е.В.** Руденская Г.Н. Получение кристаллов глутамилэндепептидазы *Bacillus intermedius* и их предварительное рентгеноструктурное исследование /IV Симпозиум «Химия протеолитических ферментов», 1997, Москва, 21-23 апреля. - С.47.

8. **Shakirov E.V.**, Balaban N.P., Sharipova M.R., Gabdrakhmanova L.A., Leshchinskaya I.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Characterization of glutamyl endopeptidase from *Bacillus internediuss* /VII Meeting of industrial applications of enzymes, 1997, Barcelona, 25-26 november, - P.170.

9. **Shakirov E.V.**, Leshchinskaya I.B., Balaban N.P., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M., Blagova E.B., Levdikov V.M., Kuranova I.P. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain 3-19. Purification, properties, cristallization /17 th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 1997, San Francisco, California, 24-29 august. - 3135.

10. Руденская Г.Н., **Шакиров Е.В.**, Балабан Н.П., Лещинская И.Б., Благова Е.В., Левдиков В.М., Куранова И.П., Степанов В.М. Глутамилэндопептидаза *Bacillus Intermedius*. Выделение, свойства, кристаллизация /Второй съезд Биохимического общества Российской Академии Наук, 1997, Москва, 19-23 мая. - С.62.

11. Kuranova I.P., Blagova E.V., Levnikov V.M., Rudenskaya G.N., Balaban N.P., **Shakirov E.V.** Crystal growth and preliminary X-ray study of glutamic acid specific proteinase from *Bacillus intermedius* /7 th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, 1998, Granada, SPAIN, 3-8 may.-P.37.

12. **Шакиров Е.В.**, Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Хузяткова Р.К., Гарусов А.В., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. Глутамилэндопептидаза *Bacillus intermedius*. Биосинтез и выделение/XI Всероссийская конференция «Ферменты микроорганизмов», 1998, Казань, 2-4 февраля. - С.70-79.

13. Gabdrakhmanova L.A., **Shakirov E.V.**, Balaban N.P., Sharipova M.R., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Biosynthesis and localization glutamylendopeptidase from *Bacillus intermedius* strain 3-19 //Microbios. - 1999. - V.100. - P.97-108.

14. Kuranova I.P., Dlagova E.V., Levnikov V.M., Rudenskaya G.N., Balaban N.P., **Shakirov E.V.** Crystal growth and preliminary X-ray study of glutamic acid specific serine protease from *Bacillus intermedius* //J.Crystal Growth. - 1999. - V.196.- P.313-318.

15. **Shakirov E.V.**, Gabdrakhmanova L.A., Balaban N.P., Sharipova M.R., Leshchinskaya I.B., Rudenskaya G.N. Effects of culture components on the biosynthesis of glutamylendopeptidase *Bacillus intermedius* /The Protein Society Thirteenth Symposium, 1999, Boston, Massachusetts, 24-28 july.

16. Sharipova M.R., **Shakirov E.V.**, Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Localization of glutamylendopeptidase and thiol-dependent serine proteinases in *Bacillus intermedius* cells /The Protein Society Thirteenth Symposium, 1999, Boston, Massachusetts, 24-28 july.

17. **Шакиров Е.В.**, Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б. Биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* //Микробиология. - 2000. - Т.69, N1. - С.29-33.



2-00

Подписано в печать 28.04.2000 г.
Усл. печ. л. 1,5. Тираж 80 экз.
Отпечатано в издательском комплексе
Управления международных связей КГУ